



Con la diagnosi genetica preimpianto sono nati oltre mille bambini sani

La tecnica vietata in Italia serve a individuare gli embrioni privi di gravi malattie genetiche e alterazioni cromosomiche oltre che per i trapianti di cellule del cordone ombelicale

ANVER KULIEV, FRANCESCO FIORENTINO

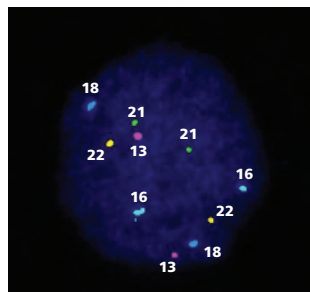
LO SCORSO SETTEMBRE IN ITALIA ha fatto clamore il caso di Luca, il bambino di origine turca affetto da talassemia che è stato curato con trapianto di cellule staminali prelevate dal cordone ombelicale delle sue sorelle gemelle. La nascita delle due bambine, non affette da talassemia e istocompatibili con il fratello maggiore, è stata resa possibile dal ricorso alle tecniche di fecondazione assistita e alla diagnosi genetica preimpianto. Da 12 embrioni allo stadio di 8 cellule è stata prelevata una cellula (o blastomero). Queste cellule sono state sottoposte contemporaneamente ad analisi del DNA per la ricerca di mutazioni associate alla β talassemia e tipizzazione del complesso maggiore di istocompatibilità (*Human leukocyte antigen* o HLA) mediante reazione di microsequenziamento (*minisequencing*); tre embrioni sono risultati privi della malattia e al tempo stesso dotati di geni dell'HLA identici a quelli di Luca, e quindi adatti a evitare reazioni di rigetto nel successivo trapianto¹. Da questi embrioni, selezionati in Turchia nell'Istanbul Memorial Hospital da uno degli autori di questo articolo, sono nate due gemelle, il cui cordone ombelicale è servito per estrarre le cellule staminali che sono state trapiantate al piccolo Luca al Policlinico San Matteo di Pavia.

Nonostante lo scalpore suscitato da questa notizia, la diagnosi genetica preimpianto (PGD) – che viene eseguita sugli embrioni generati in vitro prima del trasferimento in utero – è una tecnica che ha quasi 15 anni e si è ormai affermata come opzione clinica nella medicina riproduttiva. Pur essendo stata introdotta nel 1990 per diagnosticare solo malattie genetiche caratterizzate da ereditarietà di tipo mendeliano – il primo gene testato è stato quello per la fibrosi cistica – il campo di applicazione è andato via via allargandosi. Attualmente esistono protocolli diagnostici per oltre 90 malattie monogeniche, sia autosomiche dominanti sia recessive o legate al cromosoma X. Patologie genetiche molto diffuse in cui la PGD oggi trova applicazione comprendono β talassemia, anemia falciforme, emofilia A e B, distrofia muscolare di Duchenne-Becker, distrofia miotonica, fibrosi cistica, atrofia muscolare spinale, sindrome di Lesch-Nyhan, malattia di Charcot-Marie-Tooth, alfa-1-antitripsina e X-fragile. Nel 1993-1994 l'introduzione dell'analisi con ibridizzazione in situ con sonde fluorescenti (FISH) per i disordini cromosomici ha fatto sì che il numero di cicli di PGD raddoppiasse annualmente. Un altro passo in avanti è stato fatto, a partire dal 1996, quando è diventato possibile identificare le traslocazioni cromosomiche – alterazioni in cui un segmento cromosomico cambia posizione – grazie allo sviluppo di diversi

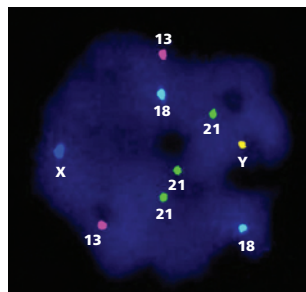


GENEVIEVA TORO / CONTRASTO

tipi di sonde (dapprima quelle FISH locus-specifiche, poi quelle subtelomeriche). Chi è portatore di traslocazioni bilanciate – ovvero anomalie di struttura dei cromosomi che non comportano perdita né guadagno di materiale genetico – è perfettamente sano, ma un'alta percentuale dei suoi gameti può presentare gravi anomalie cromosomiche. Queste persone hanno una probabilità inferiore alla media di mettere al mondo figli sani, ma la PGD consente loro di selezionare gli embrioni privi di pericolose traslocazioni sbilanciate.



Uso della FISH per riconoscere un embrione con trisomia 21 (la sindrome di Down). Una cellula prelevata dall'embrione è trattata con sonde fluorescenti di vari colori, ciascuna delle quali si lega a un diverso cromosoma, e poi è osservata con il microscopio a fluorescenza. Un sistema di analisi d'immagine conta i punti luminosi relativi a ciascun cromosoma. A sinistra c'è una cellula normale, con due copie dei cromosomi 13, 16, 18, 21 e 22. Nella cellula a destra, invece, i tre puntini verdi rivelano la presenza di tre cromosomi 21.



Un'ulteriore espansione si è verificata nel 1999, quando la tecnica è stata applicata per la prima volta a malattie a insorgenza tardiva, come Alzheimer e tumori a base genetica. Si può stimare che nel mondo siano stati eseguiti in tutto oltre 6.000 cicli e che i bambini nati siano almeno un migliaio. Il tasso di malformazioni congenite di questi bambini, che in precedenza appariva nell'ordine del 5 o 6%, non sembra diverso da quello della popolazione generale. Grazie all'accresciuta accuratezza dell'analisi genetica e all'allargarsi delle indicazioni oltre quelle previste per la diagnosi prenatale, il ricorso alla PGD è in costante crescita. Ogni anno vengono effettuati circa 1.000 cicli in tutto il mondo e negli ultimi due anni le nascite avvenute dopo PGD hanno quasi eguagliato il numero dei bambini venuti al mondo allo stesso modo nei primi dieci anni di vita della tecnica.

Tra i centri più attivi in questo settore, che coprono circa tre quarti dei casi eseguiti, rientrano il Reproductive Genetics Institute di Chicago, il Saint Barnabas Medical Center di West Orange nel New Jersey e il Simer di Bologna². In questi centri sono stati eseguiti in tutto 4.748 cicli di PGD, di cui 4.216 riguardanti le alterazioni cromosomiche e 532 per malattie monogeniche, che hanno portato alla nascita di 754 bambini e a 207 gravidanze ancora in corso. L'esperienza italiana naturalmente non si limita al Simer. Tra i laboratori più attivi del paese c'è il Centro Genoma di Roma dove, per quanto riguarda le malattie monogeniche, sono stati eseguiti 197 cicli di PGD per 23 differenti condizioni genetiche, con la nascita di 32 bambini e 12 gravidanze ancora in corso³. La PGD ha consentito a centinaia di coppie ad alto rischio di malattie genetiche non solo di

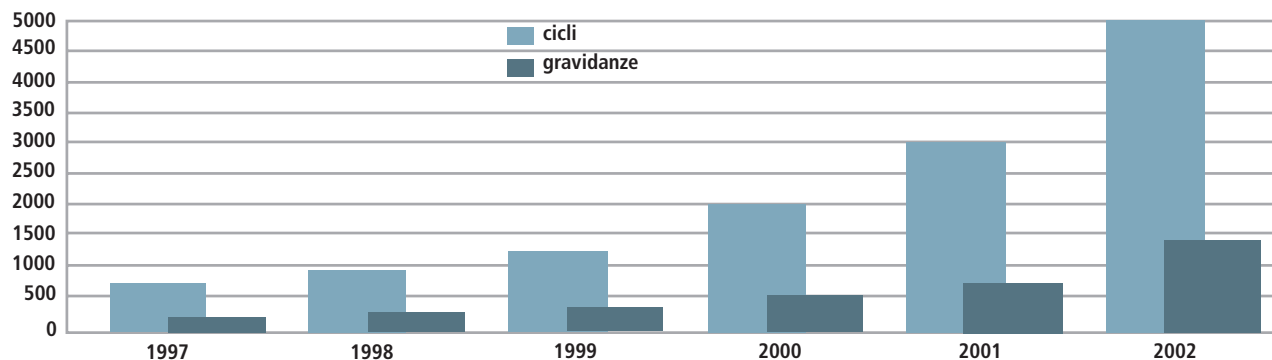
avere figli sani, ma soprattutto di raggiungere questo risultato senza correre il rischio di un'interruzione di gravidanza dopo una diagnosi prenatale tradizionale effettuata entro le prime 10-16 settimane di gestazione (amniocentesi e villocentesi). Senza PGD probabilmente sarebbero nati ben pochi di questi bambini.

L'impatto numerico maggiore

della PGD comunque riguarda le pratiche standard di riproduzione assistita, dove questa tecnica, che serve per aumentare l'efficienza della fecondazione in vitro, si appresta a diventare di routine per le coppie in cui la donna ha un'età superiore ai 37 anni, e quindi la qualità degli ovociti è in fase di declino fisiologico, oppure per le coppie in cui le tecnologie convenzionali di riproduzione assistita non hanno avuto successo. Identificando con l'aiuto di opportune sonde gli embrioni euploidi, cioè quelli che non presentano anomalie nel numero dei cromosomi, sembra possibile superare le limitazioni delle pratiche classiche, che prevedono una selezione degli embrioni da trasferire in utero soltanto su base morfologica. Il trasferimento degli embrioni euploidi, che sono anche i più vitali, consente di aumentare il tasso di successo in pazienti che avrebbero ben poche chance di portare a termine una gravidanza con le tecniche classiche.

Nei tre centri più attivi sono nati 564 bambini in seguito a test per l'aneuploidia e in 3 di questi casi si è verificato un errore di diagnosi, perciò è necessario che si continui a lavorare per migliorare l'accuratezza dell'analisi. I test per le aneuploidie inoltre potrebbero rivelarsi utili per suddividere in sottogruppi le copie che hanno già dovuto affrontare senza successo dei cicli di fecondazione in vitro e valutare l'opportunità di proseguire o meno con i tentativi⁴. Le coppie che generano almeno due embrioni euploidi durante il primo ciclo di trattamento possono essere incoraggiate a continuare, mentre quelle che hanno soltanto embrioni aneuploidi al primo tentativo hanno la tendenza a ripetere la stessa performance anche nei trattamenti successivi e quindi dovrebbero essere assistite nella difficile decisione di rinunciare, oppure considerare la possibilità di una donazione di gameti dopo aver effettuato un'analisi cromosomica di ovociti e spermatozoi della coppia.

USO DELLA PGD PER LA DIAGNOSI DI ANEUPLOIDIE



I dati riportati sono cumulativi, indicano cioè il totale degli interventi eseguiti fino all'anno in questione. Liberamente adattato da Kuliev and Verlinsky: *Reprod. Biomed. Online* 8, 229-235, 2004.

In aumento è anche il numero di interventi per creare donatori di cellule staminali HLA compatibili, come quello che ha portato alla nascita delle sorelline di Luca. La presenza di geni HLA identici tra donatore e ricevente infatti è un requisito indispensabile per far sì che le cellule staminali si insedino e attecchiscano. Il più grande studio sul trapianto di midollo per le emoglobinopatie, o malattie ereditarie dovute a errori nella sintesi dell'emoglobina come talassemia e anemia falciforme, comprende oltre 1.000 pazienti e presenta una percentuale di successi superiore all'80% per soggetti con età inferiore a 17 anni. Tuttavia a causa della dimensione ridotta dei nuclei familiari solo un terzo dei pazienti dispone di una sorella o di un fratello HLA identico. Il 3% degli esclusi può trovare un donatore con uno o due aplotipi ancestrali identici utilizzando una ricerca familiare estesa.

Per gli altri l'unica possibilità è l'identificazione di un donatore non imparentato attraverso l'utilizzo di appositi registri nazionali. Il trapianto di cellule staminali del cordone ombelicale ha il potenziale di espandere ulteriormente il pool dei donatori per i pazienti che non trovano la combinazione genetica giusta in famiglia. Questo approccio è stato già utilizzato per 2.500 bambini e oltre 1.000 adulti. Il trapianto di cellule staminali del cordone ombelicale consente un grado di diversità maggiore dei geni HLA tra donatore e ricevente, ma la disponibilità di unità che derivano da un fratello HLA identico offre maggiori garanzie, consentendo trapianti più precoci e un minor rischio di complicazioni e mortalità legata al trattamento.

Disporre di un fratello donatore HLA identico è di particolare utilità per i pazienti affetti da anemia di Fanconi – una malattia spesso fatale di cui esiste un cluster in provincia di Benevento – che le cellule del cordone ombelicale consentono di trattare con successo in oltre l'85% dei casi. La nascita del primo bambino-donatore, che è avvenuta nel 2000 nel centro di Chi-

cago a opera di uno dei due autori di questo articolo, è servita proprio a trattare una bambina affetta da anemia di Fanconi⁵.

Diagnosi o lotteria

In precedenza le coppie con un figlio affetto da questa malattia erano costrette ad affidarsi alla lotteria genetica della riproduzione naturale, tentando il concepimento di un altro bambino che fungesse da donatore e valutando la compatibilità HLA solo a gravidanza avanzata grazie a villocentesi e amniocentesi. In questo modo sono state avviate più di 80 gravidanze, di cui una nel 1988 ha portato al primo trapianto di cellule del cordone ombelicale coronato da successo⁶. La probabilità teorica di avere un bambino sano e allo stesso tempo dotato dei geni HLA compatibili però è soltanto di uno su cinque. Addirittura studi condotti sugli embrioni hanno evidenziato che la probabilità reale diventa di circa uno su otto a causa degli eventi di ricombinazione. Molte di queste famiglie perciò hanno dovuto affrontare gravidanze ripetute, ritardando il trapianto e rischiando di dover scegliere la dolorosa strada dell'aborto nel caso in cui i feti fossero risultati malati. In confronto la diagnosi genetica preimpianto offre vantaggi più che evidenti, perché consente di testare un numero sufficiente di embrioni per volta, aumentando le possibilità di trovare quelli con le caratteristiche adatte per la donazione. Ma soprattutto la PGD permette di identificare questi embrioni prima che venga avviata una gravidanza, eliminando il rischio che vengano abortiti i feti che non risultano HLA compatibili.

La caduta del divieto

Un convegno che recentemente si è svolto a Cipro ha consentito di fare il punto sulla diffusione di questo approccio, che tecnicamente viene definito "PGD for HLA matching" o "Preimplantation HLA matching" ed è già stato applicato in cinque paesi – Stati Uniti,

ALCUNE DELLE PIÙ DIFFUSE CONDIZIONI PER CUI È APPLICABILE LA DIAGNOSI GENETICA PREIMPIANTO

AUTOSOMICHE RECESSIVE	AUTOSOMICHE DOMINANTI	LEGATE AL CROMOSOMA X	DA ESPANSIONE DI TRIPLETTE RIPETUTE	ALTRE
fibrosi cistica	neurofibromatosi	distrofia muscolare di Duchenne-Becker	sindrome dell'X fragile	tipizzazione Hla
beta-talassemia	sindrome di Li-Fraumeni	emofilia A e B	distrofia miotonica	predisposizioni a tumori
anemia falciforme	poliposi adenomatosa familiare		malattia di Huntington	malattie a insorgenza tardiva
atrofia muscolare spinale	acondroplasia e ipocondroplasia			
iperplasia surrenale congenita	neoplasia endocrina multipla tipo 2			
anemia di Fanconi	sindrome di Marfan			
deficit di acil-CoA deidrogenasi a catena media (MCAD)	osteogenesi imperfetta			
malattia di Tay-Sachs	sclerosi tuberosa di Bourneville			
deficit di alfa-1-antitripsina	retinite pigmentosa			
epidermolisi bollosa	retinoblastoma			

Gran Bretagna, Australia, Belgio e Turchia – ma è consentito anche in altri come Belgio e Francia. La maggioranza dei 147 cicli effettuati ha riguardato casi di β talassemia e anemia di Fanconi ma la lista di malattie interessate è lunga ed è destinata a crescere. Circa l'80% delle coppie si è rivolta ai centri di Chicago e Istanbul, che hanno già visto nascere 15 bambini potenziali donatori per i fratelli bisognosi di un trapianto di midollo osseo⁷. Tra questi casi ce ne sono anche alcuni per i quali è stato eseguito soltanto il test di compatibilità HLA, perché l'embrione non era a rischio di malattie genetiche. I fratelli in attesa di trapianto, infatti, erano affetti da malattie non ereditarie come leucemia e anemia sporadica di Diamond-Blackfan. Considerazioni di tipo etico hanno reso più difficile l'accesso di questi piccoli pazienti ai trapianti salvavita: nel caso delle malattie ereditarie, infatti, la diagnosi genetica preimpianto serviva anche per assicurare la salute del concepito oltre che a garantire l'istocompatibilità per la donazione, mentre per malattie non ereditarie il nuovo nato non trarrebbe alcun vantaggio dalla tecnica utilizzata per concepirlo. È così che nell'aprile del 2003 l'authority britannica – Human Fertilisation & Embryology Authority – ha dato il via libera per eseguire la tipizzazione HLA per curare un bambino talassemico, mentre l'anno prima aveva respinto un'analogia richiesta presentata dai genitori di un piccolo malato di anemia di Diamond-Blackfan. La coppia inglese perciò ha dovuto recarsi negli Stati Uniti e il bambino è in corso di guarigione grazie al trapianto di midollo osseo donato dal fratellino di un anno⁸.

Da allora però si sono accumulati dati secondo cui i rischi corsi dagli embrioni durante la biopsia effettuata per eseguire la diagnosi genetica preimpianto sono minimi e nel luglio di quest'anno l'authority britannica ha annunciato la caduta del divieto. In Italia invece la legge 40 sulla fecondazione assistita non so-

lo ha messo fuori legge il *preimplantation HLA matching*, spingendo dieci coppie a rivolgersi in Turchia come hanno fatto i genitori di Luca, ma ha vietato tutti i tipi di diagnosi genetica preimpianto, per le coppie a rischio di malattie genetiche, traslocazioni, malattie a insorgenza tardiva e aneuploidie.

Anver Kuliev dirige il WHO Collaborating Center for Prevention of Genetic Disorders al Reproductive Genetics Institute di Chicago.

Francesco Fiorentino è direttore del Laboratorio Genoma di Roma

Note

- 1) Fiorentino F. et al., Development and clinical application of a strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders combined with HLA matching, *Molecular Human Reproduction* Vol 10, N. 6, pp. 445-460, 2004
- 2) Verlinsky Y. Et al., Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: a multicenter report, *Fertility and Sterility*, Vol. 82, N. 2, 292-294, 2004
- 3) Fiorentino et al., The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders, *Molecular Human Reproduction*, Vol. 9, N. 7, pp. 399-410, 2003
- 4) Ferraretti A. P et al., Prognostic role of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in assisted reproductive technology outcome, *Human Reproduction*, Vol. 19, N. 3, pp. 694-699, 2004)
- 5) Verlinsky et al, Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching, *JAMA*, vol. 285, 3130-3133, 2001
- 6) Gluckman E. et al., Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from HLA-identical sibling, *New England Journal of Medicine*, Vol. 321, pp. 1174-1178, 1989
- 7) Kuliev A., Verlinsky Y., Preimplantation HLA typing and stem cell transplantation; report of international meeting, Cyprus, 27-28 March, 2004, *RBM Online*, Vol. 9, N. 2, 205-209, 2004
- 8) Verlinsky et al., Preimplantation HLA testing, *JAMA*, Vol. 291, N. 17; 2079-2085, 2004